

**Untersuchungen über die
Gewebeverteilung exogen zugeführter
Asparaginase bei Mäusen**

von

Ulrich Wierer

aus

Berlin

1977 #94

Aus dem Institut für experimentelle Pathologie
der Farbenfabriken Bayer AG.
Vorstand: Professor Dr. E. Grundmann

Untersuchungen über die Gewebeverteilung exogen zugeführter Asparaginase bei Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Ulrich Wierer

aus

Berlin

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:	Prof. Dr. W. Schiefer
Referent:	Prof. Dr. F. Heim
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. J. Pütter
Tag der mündlichen Prüfung:	2. 2. 1971

Herrn Professor Dr. F. Heim, Vorstand des
Pharmakologischen Institutes der Universität
Erlangen-Nürnberg, danke ich für die wohl-
wollende Förderung.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. J. Pütter, Wuppertal,
der diese Arbeit anregte und leitete, möchte
ich mich besonders herzlich bedanken für die
vielen Ratschläge und das mir stets entgegen-
gebrachte Verständnis.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. E. Grundmann,
Vorstand des Institutes für experimentelle
Pathologie der Farbenfabriken Bayer AG, für die
freundliche Unterstützung und die Erlaubnis,
den experimentellen Teil dieser Arbeit in den
Laboratorien des Institutes durchzuführen.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. <u>Allgemeiner Teil</u>	1
2. <u>Problemstellung</u>	5
3. <u>Materialien</u>	7
3.1. Tumoren und Mäusestämme	7
3.2. Enzym-Präparat	8
3.3. Reagenzien	8
3.4. Lösungen	8
3.5. Verwendete Geräte	9
4. <u>Methoden</u>	10
4.1. Vorbehandlung der Versuchstiere	10
4.2. Blutgewinnung	10
4.3. Entnahme der Organe und Tumoren	10
4.4. Aufbereitung der Organe und Tumoren	11
4.5. Bestimmungsmethode der ASNase-Aktivität	11
4.5.1. Analysenwert	12
4.5.2. t_0 -Wert	12
4.5.3. Extinktionsdifferenz	13
4.6. Berechnung der gefundenen ASNase-Aktivität	13
4.6.1. Verdünnungsfaktor V	14
4.7. Durchgeführte Bestimmungen	14
4.7.1. Bestimmung des ASNase-Standardwertes	14
4.7.2. Bestimmung der Aktivität von in vitro zugesetzter ASNase	15
4.7.3. Bestimmung der ASNase-Eigenaktivität	15
4.7.4. Bestimmung der ASNase-Aktivitäten in Geweben und im Plasma behandelter Mäuse	15
4.7.5. Bestimmung der ASNase-Aktivität des Rest- blutes in den Geweben von behandelten Mäusen	15
4.7.6. Aktivitätsbestimmung der injizierten Fremd- ASNase in den Geweben von behandelten Mäusen	16

	<u>Seite</u>
4.8. Statistische Auswertung	16
4.9. Fehlerabschätzung	16
4.9.1. Untere Nachweisgrenze	16
4.9.2. Analysengenauigkeit	17
4.9.2.1. Verdünnungsfehler	17
4.9.2.2. Fehler bei der Neßler-Reaktion	17
4.9.2.3. Fehler bei der photometrischen Auswertung	17
4.9.2.4. Gesamter Analysenfehler	17
4.9.3. Dosierungsfehler	18
4.9.3.1. Aktivitätsverlust beim Lösen der ASNase	18
4.9.3.2. Fehler bei der Applikation	18
5. <u>Ergebnisse</u>	20
5.1. Vorversuche	20
5.1.1. Versuche in vitro: Aktivitätsverhalten zugesetzter Fremd-ASNase in Gewebe-Homogenaten	20
5.1.2. ASNase-Gewebespiegel als Funktion der Zeit	22
5.2. Hauptversuche	22
5.2.1. Gewebeaktivitäten unbehandelter Mäuse (Eigenaktivität)	24
5.2.2. ASNase-Aktivitäten bei behandelten Mäusen	27
5.3. Zusatzversuche	30
5.3.1. ASNase-Spiegel des subcutan wachsenden Gardner-Lymphoms 6C3HED-OG	30
5.3.2. ASNase-Spiegel von Metastasen des aszitesförmigen Gardner-Lymphoms 6C3HED-OG	31
5.3.3. ASNase-Spiegel der Tumorzelle (Gardner-Lymphom 6C3HED-OG)	32
5.3.4. Restblutbestimmung	34
6. <u>Diskussion</u>	35
7. <u>Zusammenfassung</u>	41
Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen	IIa
Literaturverzeichnis	III

1. Allgemeiner Teil

Im Jahr 1904 machte Lang¹⁾ als erster die Beobachtung, daß tierische Gewebe aus L-Asparagin (ASN) Ammoniak freizusetzen vermögen. Im Jahr 1922 versuchte Clementi²⁾ durch eine großangelegte Untersuchung über das Vermögen tierischer Gewebe, ASN zu desaminieren, eine Erklärung zu finden. Er fand einen, allerdings nicht strengen Zusammenhang zwischen dem Desaminierungsvermögen und der Ernährung, indem er nachweisen konnte, daß zumindest in der Gruppe der Säugetiere nur Gewebe von Pflanzenfressern dieses Vermögen besaßen. Ferner bewies er, daß diese Eigenschaft auf ein Enzym zurückzuführen ist, und nannte dieses Enzym L-Asparaginase (ASNase). Bei den Säugern konnte Clementi ASNase vor allem in den Geweben und im Serum des Meerschweinchens nachweisen, nicht dagegen in den Blutzellen; bei der weißen Ratte fand er das Enzym nur im Lebergewebe, wobei aber zu berücksichtigen ist, daß die von Clementi angewandte Nachweismethode relativ unempfindlich war. Die Maus untersuchte Clementi nicht.

Im Jahr 1953 machte Kidd³⁾ die Beobachtung, daß einige maligne Lymphome von Maus und Ratte unterdrückt wurden, wenn man den Tieren wiederholt Meerschweinchenserum (MSchS) injizierte, während einige andere Tumoren nicht zu beeinflussen waren.

Broome⁴⁾⁵⁾⁶⁾ war es, der 1961 nachweisen konnte, daß der Hemmfaktor des MSchS identisch mit der ASNase ist. Dieses Ergebnis wurde in der Zwischenzeit von einer Reihe weiterer Autoren bestätigt⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾. Eine Hemmung als Folge einer Immunreaktion auf der Grundlage einer Histoinkompatibilität wurde ausgeschlossen¹⁷⁾¹⁸⁾.

Alle Tumoren, die auf eine Behandlung mit MSchS bzw. ASNase hin in ihrem Wachstum gehemmt werden - im folgenden

als ASNase-sensible Tumoren bezeichnet - sind nach Kidd und Sobin¹⁶⁾ in ihrer Entwicklung abhängig von äußerer ASN-Zufuhr; bei einem Mangel an ASN tritt Hemmung ein, weil die Zellen dieser Tumoren nicht in der Lage sind, das zur Proteinsynthese benötigte ASN in ausreichender Menge selbst zu synthetisieren¹⁹⁾.

Über den Mechanismus der Tumorphemmung durch ASNase ergibt sich aus den bisher veröffentlichten Arbeiten zusammenfassend folgendes¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾: Das Enzym führt bei ASNase-sensiblen Tumorzellen durch Hydrolyse zu einer Verarmung an ASN. Da diese Aminosäure ein fester Bestandteil sämtlicher Proteine ist, wird als Folge dieses Mangelzustandes die Proteinsynthese der Tumorzellen gehemmt und damit auch die Synthese anderer lebenswichtiger Substanzen, vor allem der Nucleinsäuren, unterdrückt. Dadurch entstehen irreversible Zellschädigungen. Neben der Hemmung der Proteinsynthese vermutet Broome einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt in einem beobachteten Anstieg der intrazellulären Aminosäuren¹⁹⁾.

Im Gegensatz zu den ASNase-sensiblen besitzen die ASNase-resistenten Tumoren - diejenigen Tumoren also, die durch ASNase in ihrem Wachstum nicht gehemmt werden - die Fähigkeit, bei fehlender ASN-Zufuhr den Bedarf durch intrazelluläre Synthese selbst zu decken²⁰⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾. So konnte in zellfreien Extrakten resistenter Tumoren, wie übrigens auch in einigen normalen Geweben, ein ASN-Synthetase-System nachgewiesen werden, welches Asparaginsäure, Glutamin und ATP verwertet und vermutlich über die Konzentration des intrazellulären ASN gesteuert wird¹⁹⁾.

Die Empfindlichkeit maligner Zellen gegenüber ASNase ist nicht allzu häufig; am besten sprechen Mäuseleukämien an: Von 109 Leukämien, die Boyse et al.¹⁷⁾ untersuchten, wurden 26 durch MSchS unterdrückt. Daneben erwiesen sich auch einige experimentelle Tumoren der Ratte³⁾²⁷⁾²⁸⁾ und Lymphosarkome

des Hundes²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾ als ASNase-sensibel.

Die klinischen Versuche am Menschen ergaben¹⁸⁾³¹⁾³²⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾, daß 70 % der akuten lymphatischen Leukämien auf die Behandlung ansprachen. Erfolge bei akuter myeloblastischer Leukämie wurden dagegen bisher nur in Einzelfällen beobachtet.

In der Natur ist ASNase weitverbreitet⁴⁰⁾. Neben dem Serum und der Leber des Meerschweinchens⁴¹⁾⁴²⁾ sowie des Agouti, einem nahen Verwandten des Meerschweinchens, wurden weitere Enzym-Quellen untersucht: Kalbsleber⁴³⁾, Hühnerleber⁴⁴⁾, Hefe⁴⁵⁾⁴⁶⁾ und andere. Entscheidend aber war erst die Entdeckung von Wriston et al.⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾, die erstmals die hohe spezifische Aktivität und tumorhemmende Wirkung der ASNase von *Escherichia coli* und anderen Bakterien feststellten. Heute kann das Enzym aus Kulturen von *Escherichia coli*⁵⁰⁾, *Serratia marcescens*⁴⁸⁾ und *Erwinia carotovora*⁵¹⁾ gewonnen werden.

In Deutschland ist es Arens et al.³³⁾, Wuppertal, gelungen, die Darstellung der ASNase aus *Escherichia coli*, auch in großtechnischer Hinsicht, befriedigend zu lösen.

Bei der Prüfung der einzelnen Enzym-Präparate auf ihre Antitumor-Wirkung hin ergaben sich bemerkenswerte Unterschiede. So zeigte die aus Hefe isolierte ASNase überhaupt keine Wirkung auf das Lymphom 6C3HED⁴⁵⁾, das auf andere Präparate gut anspricht. MSchS-ASNase zeigte sich zwei- bis dreimal so wirksam wie das aus der Leber des Meerschweinchens⁴²⁾ oder aus Hühnerleber⁴⁴⁾ dargestellte Enzym. Aus Kulturen von *Escherichia coli* konnten zwei ASNasen, EC-1 und EC-2, isoliert werden. Während sich EC-2 als hochwirksam erwies, zeigte EC-1 keine tumorhemmende Wirkung⁵⁰⁾.

Broome gab einige Faktoren an, die die unterschiedliche Wirksamkeit der einzelnen Präparate erklären könnten⁴⁶⁾. Einmal

die V e r w e i l d a u e r in vivo: Das unwirksame Hefepräparat war schon nach 30 Minuten aus dem Blut eliminiert, während die Halbwertszeit der wirksamen MSchS-ASNase im Mäuseblut 11 bis 19 Stunden betrug. Andererseits aber zeigten sich Präparate aus Escherichia coli, die bei gesunden Mäusen mit einer Halbwertszeit von 1 bis 3 Stunden eliminiert wurden, gegen Mäuse-Lymphome wirksamer als MSchS- oder Agoutiserum-ASNase, obwohl diese eine Halbwertszeit von 10 bis 19 Stunden aufwiesen. Dieser Widerspruch ist zum Teil durch die Beobachtung zu erklären, daß man bei Mäusen mit transplantierten 6C3HED-Lymphomen eine E r h ö h u n g d e r H a l b w e r t s z e i t für E. coli-ASNase um annähernd das 10-fache findet⁴⁶⁾. Hinzu kommt noch ein weiterer Faktor, nämlich die unterschiedliche R e a k t i o n s - k i n e t i k : Die Michaelis-Konstante für Agoutiserum-ASNase wird von Broome mit $4.11 \times 10^{-5} \text{M}$ angegeben und liegt somit oberhalb der physiologischen ASN-Konzentration im Mäuseplasma⁵²⁾. Für ASNase aus Escherichia coli aber liegt die Michaelis-Konstante beträchtlich tiefer, nach Broome bei $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$, nach Pütter⁵³⁾ sogar bei $9.8 \times 10^{-6} \text{M}$. Beim Vergleich der ASNase-Präparate aus Agoutiserum und aus Escherichia coli fiel Broome noch ein weiterer Faktor auf: Er behandelte gesunde Mäuse mit beiden Präparaten und fand nur bei den Tieren, die mit dem Coli-Präparat behandelt worden waren, einen tiefbleibenden ASN-Spiegel im Blut, auch noch nach vollständiger Elimination des Enzyms aus dem Blut, verbunden mit einem A n s t i e g d e r L e b e r - A S N a s e um das 5-fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren; ob es sich dabei um eine Aktivierung oder Speicherung der E. coli-ASNase in der Leber handelt, ist noch nicht geklärt.

2. Problemstellung

Bei der unterschiedlichen Antitumor-Wirkung der einzelnen ASNasen spielt möglicherweise neben den bisher diskutierten Punkten noch ein weiterer Faktor eine Rolle, nämlich die Permeierfähigkeit des Enzyms aus dem Blut in das Gewebe. Wenn die ASNase in das Gewebe eindringen kann und dort im Interstitium das ASN abbaut, so ist dies wahrscheinlich wirkungsvoller als die Unterbindung der ASN-Zufuhr lediglich im Blut; denn nur im erstgenannten Fall wäre die ASNase in der Lage, auch den ASN-Austausch von Zelle zu Zelle zu unterbinden.

Von vielen Medikamenten, besonders den Chemotherapeutika, ist die Bedeutung ihrer Gewebegängigkeit für die Therapie längst bekannt und auch eingehend untersucht. Dagegen ist die Frage, inwieweit applizierte Fremd-Enzyme nach intravenöser oder intraperitonealer Injektion die Blutbahn verlassen und in das Gewebe eindringen können, bisher kaum untersucht worden. Das gilt auch für die ASNase. Es erschien uns deshalb wichtig, den ASNase-Gehalt von Blut und Geweben nach Applikation systematisch zu untersuchen. Es sollte damit noch ein weiterer Gesichtspunkt geklärt werden, denn es war denkbar, daß der Unterschied zwischen sensiblen und resistenten Tumoren auch durch eine unterschiedliche Aufnahmefähigkeit für ASNase zustandekommen konnte. Eine zusätzliche Frage, deren Untersuchung uns wichtig erschien, war die, ob die eventuell im Gewebe nach ASNase-Injektion aufgefundene Aktivität nur auf dem Enzymgehalt der interzellulären Flüssigkeit beruht, oder ob die ASNase auch in der Lage ist, in Tumorzellen einzudringen. Bei niedermolekularen Therapeutika wird die letztere Fähigkeit meist als selbstverständlich angesehen; jedoch ist dies bei unversehrten Enzymmolekülen keineswegs vorauszusagen. Zur Klärung der Wirkungsweise zugeführter ASNase in vivo ist diese Frage natürlich von Bedeutung.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde als Versuchstier die Maus gewählt, da alle wesentlichen Tierversuche in diesem Zusammenhang an Mäusen durchgeführt wurden.

Zunächst mußte festgestellt werden, inwieweit bereits Organe unbehandelter Mäuse eine ASNase-Aktivität aufweisen. Auch hierüber befinden sich in der Literatur bisher keine ausreichenden Hinweise, und die Klärung dieser Frage ist als ein Nebenziel dieser Arbeit zu betrachten. Ferner war zu untersuchen, ob die ASNase, die Mäusegeweben zugesetzt wird, unverändert wiedergefunden werden kann.

3. Materialien

3.1. Tumoren und Mäusestämme

Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Tumoren und Mäusestämme verwendet:

Gardner-Lymphom, 6C3HED-OG, als Aszites-Tumor und als subcutan wachsender Tumor, beide in Verbindung mit männlichen C3H/HEJ-Mäusen, die von den Jackson-Laboratories, USA, geliefert wurden. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 23 und 28 g. Der Aszites-Tumor wurde durch intraperitoneale Überimpfung von 0.5 ml Aszites mit ca. 5×10^6 Zellen erzeugt und 6 Tage nach der Transplantation ausgewertet. Der subcutan wachsende Tumor wurde an der Flanke durch Applikation von ebenfalls 0.5 ml Aszites mit ca. 5×10^6 Zellen erzeugt und 8 Tage später ausgewertet. Das Gardner-Lymphom ist ASNase-sensibel.

Lymphatische Mäuseleukämie EARAD1 als subcutan wachsender Tumor in Verbindung mit männlichen B6AF1-Mäusen der Jackson-Laboratories, USA. Das Gewicht der Mäuse lag zwischen 22 und 26 g.

Es wurden ein ASNase-sensibler Tumor, EARAD1-S und ein aus diesem abgeleiteter ASNase-resistenter Tumor, EARAD1-R, untersucht. Die verwendeten Tumoren wurden durch subcutane Applikation von 0.5 ml Aszites mit 5×10^6 Zellen an der Flanke erzeugt. Die Versuche wurden am 10. (EARAD1-R) bzw. 11. Tag (EARAD1-S) nach Überimpfung durchgeführt.

Der Tumor EARAD1-R wurde von Herrn Dr. Bierling, Wuppertal, analog zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren⁵⁴⁾ gezüchtet.

Für die Überlassung des Gardner-Lymphoms und der lymphatischen Mäuseleukämien EARAD1-S und EARAD1-R bin ich Herrn Dr. Bierling zu großem Dank verpflichtet.

Ehrlich-Tumor in Verbindung mit weiblichen B60-Mäusen, einem Inzuchtstamm des Pathologischen Institutes der Farbenfabriken Bayer. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 16 und 21 g. Die Züchtung des Tumors erfolgte wie in der Literatur beschrieben⁵⁵⁾. Die Tumoren wurden 7 Tage nach der Überimpfung ausgewertet.

3.2. Enzym-Präparat

Es wurde aus *Escherichia coli* gewonnene ASNase der Farbenfabriken Bayer, Nr. FBB6366, verwendet; diese enthielt etwa 200 Einheiten pro mg. Die Dosierung erfolgte nach der Zahl der Einheiten.

Die Definition einer ASNase-Einheit (IU) ist in Abschnitt 4.5. angegeben.

3.3. Reagenzien

L(-)-Asparagin für biochemische Zwecke

E. Merck AG, Darmstadt (Katalog Nr. 1566)

Neßlers Reagenz

E. Merck AG, Darmstadt (Katalog Nr. 9028)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan, kristallisiert (= Tris)

C.F. Boehringer & Soehne GMBH, Mannheim

(Katalog Nr. 15 326 HTAB)

Trichloressigsäure p. a.

E. Merck AG, Darmstadt (Katalog Nr. 807)

ln HCl p. a.

Farbenfabriken Bayer

0.9 %-ige Kochsalzlösung, sterilisiert

Ammoniak-Lösung min. 25 % (0.91) p. a.

E. Merck AG, Darmstadt (Katalog Nr. 5432)

3.4. Lösungen

Tris/HCl-Lösung: 0.05 M Tris/HCl-Lösung von p_H 7.2 (bezogen auf 37 °C) nach⁵⁶⁾ wurde mit Wasser auf das Fünffache verdünnt.

Tris/HCl-NaCl-Lösung: 0.05 M Tris/HCl-Lösung von p_H 7.2 (bezogen auf 37 °C) wurde mit 0.9 %-iger sterilisierter Kochsalzlösung auf das Fünffache verdünnt.

ASN-Lösung: 0.1 %-ig, gelöst in Tris/HCl-Lösung.

Trichloressigsäure-Lösung: 5 %-ig, gelöst in Wasser.

3.5. Verwendete Geräte

Photometer : Zeiss PM QII

Homogenisatoren: Potter-Elvehjem-Homogenisator
Ultra-Turrax (Jahnke u. Kunkel)

Zentrifuge : Spinco-Zentrifuge, Modell L50 (Beckman)

4. Methoden

4.1. Vorbehandlung der Versuchstiere

Jede Gruppe wurde zweigeteilt. Dem einen Teil der Tiere, im folgenden als behandelte Tiere bezeichnet, wurde eine ASNase-Lösung der Dosierung 500 IU/kg Körpergewicht (ASNase gelöst in Tris/HCl-NaCl-Lösung) entweder intra-peritoneal oder intravenös injiziert. Dem anderen Teil, im folgenden als unbehandelte Tiere bezeichnet, wurde die entsprechende Menge des Lösungsmittels ohne ASNase in gleicher Weise injiziert.

Zu den jeweils angegebenen Zeiten wurden die Tiere durch Dekapitieren getötet und so weit wie möglich ausgeblutet.

4.2. Blutgewinnung

Das Blut der Halsschlagader wurde beim Dekapitieren in einem Schälchen aufgefangen, mit festem Heparin versetzt und mit Tris/HCl-NaCl-Lösung auf 1:500 verdünnt. Nach dem Abzentrifugieren der Erythrozyten (10 Minuten bei 2500 g) wurde das Plasma abpipettiert und eingefroren aufbewahrt.

4.3. Entnahme der Organe und Tumoren

Die Organe Leber, Niere, Milz, Gehirn, Herz, Muskulatur aus der Glutäalregion sowie die soliden Tumoren wurden sofort nach dem Abtöten entnommen (vorhandenes Restblut wurde auf Filtrierpapier ausgedrückt), abgewogen (Feuchtgewichtbestimmung) und bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Der Aszites-Tumor wurde beim abgetöteten Tier durch Punktieren mit einer Rekordspritze abgezogen, wobei jeweils zu 1 ml Aszitesflüssigkeit 0.25 ml Zitratlösung (0.7 %-ig, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) gegeben wurden, um Gerinnung zu vermeiden. Durch Zentrifugieren (10 Minuten bei 200 g) erfolgte die Sedimentation der Asziteszellen. Nach Abpipettieren des Aszites-Plasmas

und zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung durch Zentrifugieren, wurde das Feuchtgewicht der Asziteszellen bestimmt. Beide Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

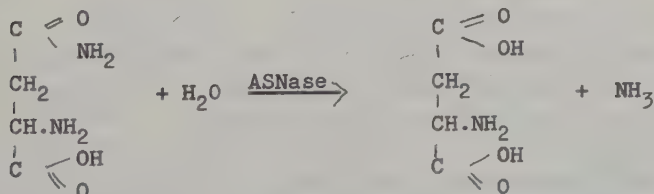
4.4. Aufbereitung der Organe und Tumoren

Die Organe, soliden Tumoren und Asziteszellen-Sedimente wurden in Tris/HCl-Lösung mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator unter Eiswasserkühlung homogenisiert und auf die gewünschte Gesamtverdünnung gebracht. (Die Angabe der Verdünnungen erfolgt in Abschnitt 4.7.). Bei diesem Aufschlußverfahren bereitete lediglich die Muskulatur Schwierigkeiten; deshalb wurde hierbei nach zwei- bis dreimaligem Auftauen und Wiedereinfrieren ein Ultra-Turrax zum Homogenisieren verwendet.

Die so gewonnenen Homogenate wurden für die Bestimmung der ASNase-Aktivität nach 4.5. verwendet.

4.5. Bestimmungsmethode der ASNase-Aktivität

Die ASNase ist eine Desaminase; sie spaltet die Aminogruppe des ASN unter Bildung von Ammoniak und L-Asparaginsäure ab:



Die ASNase-Aktivität wird in internationalen Einheiten (IU) angegeben.

Definition: Eine internationale Einheit ist diejenige ASNase-Aktivität, die bei der Hydrolyse von ASN bei 37 °C 10⁻⁶ Mol Ammoniak pro Minute freisetzt²²).

Die ASNase-Aktivität von Lösungen kann demnach bestimmt werden über die quantitative Erfassung des Ammoniaks, der von der vorhandenen ASNase bei Substratsättigung freigesetzt wird. Die quantitative Bestimmung des Ammoniaks erfolgte bei den vorliegenden Versuchen kolorimetrisch mittels einer modifizierten Neßler-Reaktion. Die Modifikation war erforderlich, um Störungen durch Tris-Puffer und ASN (Verdrängung von Ammoniak) sowie durch Serumbestandteile, z.B. Ca^{++} und Phosphat (Trübungen) zu vermeiden.

4.5.1. Analysenwert:

2 ml der zu untersuchenden Lösung wurden mit 0.75 ml ASN-Lösung versetzt und bei 37 °C in einem Wasserbad 60 Minuten lang inkubiert. Die ASN-Konzentration im Enzymsatz betrug hierbei also ca. 2.2×10^{-3} Mol/l; sofern nicht mehr als 75 % des ASN umgesetzt werden, besteht bei dieser Konzentration während der gesamten Inkubationszeit mit Sicherheit Substratsättigung (Michaelis-Konstante des verwendeten Enzym-Präparates ca. 10^{-5} M); das heißt, daß der Substratumsatz als Funktion der Zeit während der gesamten Inkubationszeit praktisch linear verläuft.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Trichlor-essigsäure-Lösung gestoppt. Vom klarzentrifugierten Überstand wurden 2 ml abpipettiert, und dazu wurden 0.5 ml Neßlers Reagenz gegeben. Eine Minute nach der Zugabe wurde am Zeiss-Photometer die Extinktion bei 450 nm gegen Luft mit einer 1cm-Glasküvette gemessen.

4.5.2. t_0 -Wert:

Der t_0 -Wert beinhaltet den Reagenzien-Leerwert und den NH_3 -Leerwert der zu untersuchenden Lösung. Hierbei wurde das Substrat erst nach der Zugabe der Trichloressigsäure-Lösung zugesetzt. Die Inkubation entfiel. Die photometrische Auswertung des klarzentrifugierten Überstandes erfolgte wie oben. Es wurden bei dieser Bestimmung die gleichen Volumina wie oben angesetzt.

4.5.3. Die Extinktionsdifferenz (E_D) aus Analysen- (E_A) und t_o -Wert (E_{to}),

$$E_D = E_A - E_{to},$$

wurde zur Berechnung der ASNase-Aktivität in Formel (1) bzw. (3) eingesetzt (siehe 4.6.).

4.6. Berechnung der gefundenen ASNase-Aktivität

Die Extinktionsdifferenz E_D ist ein Maß für den durch die ASNase freigesetzten Ammoniak und damit für die Enzym-Aktivität.

Für die Umrechnung wurde die Extinktion zugrundegelegt, die sich bei der unter 4.5. beschriebenen modifizierten Neßler-Reaktion mit einer Lösung bekannter NH_3 -Konzentration ergab: Es wurde eine Lösung von Ammonsulfat in Tris/HCl-Lösung hergestellt. Die Ammoniakkonzentration betrug dabei 10^{-6} Mol pro 2 ml; 2 ml dieser Lösung wurden mit denselben Reagenzien wie unter 4.5.1. versetzt (also mit 0.75 ml ASN-Lösung und 2 ml Trichloressigsäure-Lösung), und anschließend wurde die Neßler-Reaktion wie beschrieben durchgeführt. Nach Abzug des Reagenzien-Leerwertes ergab sich dabei eine Extinktion von 0.31 (Mittelwert aus 4 getrennten Bestimmungen).

Da die Eichkurve im fraglichen Bereich (bis Extinktionen von ca. 0.6) linear verläuft, folgt daraus: Ergibt sich bei einer Aktivitätsbestimmung nach 4.7. eine Extinktionsdifferenz von 0.31, so sind in 60 Minuten im Enzymansatz 10^{-6} Mol NH_3 durch die ASNase freigesetzt worden; in diesem Fall ergäbe sich eine ASNase-Aktivität von 1/60 IU pro 2 ml der untersuchten Lösung. Ergibt sich bei einer anderen Bestimmung die Extinktionsdifferenz E_D , so erhält man die zugehörige Enzymaktivität a der untersuchten Lösung nach folgender Beziehung:

$$\text{Formel (1)} \quad a = \frac{1}{60} \frac{E_D}{0.31} = \frac{E_D}{18.6} \quad [\text{IU}/2 \text{ ml}] \quad \text{oder}$$

$$\text{Formel (2)} \quad a' = 2.69 \cdot 10^{-2} E_D \quad [\text{IU}/\text{ml}]$$

Ist die untersuchte Lösung eine Gewebe- oder Plasmaverdünnung und soll die Enzymaktivität auf 1 g Gewebe bzw. 1 ml Plasma bezogen werden, so muß (2) noch mit dem Verdünnungsfaktor V (siehe unten) multipliziert werden, und es ergibt sich für die Enzymaktivität A von 1 g Gewebe (Frischgewicht) bzw. 1 ml Plasma

$$\text{Formel (3)} \quad A = 2.69 \cdot 10^{-2} \cdot V \cdot E_D \quad [\text{IU/g}] \text{ bzw. } [\text{IU/ml}]$$

4.6.1. Verdünnungsfaktor V

Für die Gewebebestimmungen wurde $V = 100$ oder $V = 200$ (Verdünnung 1:100 bzw. 1:200) gewählt, d.h., daß der Extrakt aus 1 g Frischgewebe in 100 bzw. 200 ml Lösung enthalten war.

Die Plasmaverdünnungen wurden wie in 4.2. beschrieben aus Blutverdünnungen 1:500 ($V_{\text{Blut}} = 500$) gewonnen. V_{Plasma} läßt sich also aus V_{Blut} berechnen, wenn der Hämatokritwert des Blutes bekannt ist. Der Hämatokrit wurde im Mittel für gesunde Mäuse mit 45.7 % und für leukämische Mäuse mit 23.7 % bestimmt. Da 1 ml Blut demnach 0.543 bzw. 0.763 ml Plasma enthält, ergibt sich V_{Plasma} aus V_{Blut} durch Multiplikation mit $1/0.543 = 1.84$ bzw. $1/0.763 = 1.31$:

$$\begin{array}{lll} \text{gesunde Mäuse} & : & V_{\text{Plasma}} = 1.84 \cdot V_{\text{Blut}} = 920 \\ \text{leukämische Mäuse} & : & V_{\text{Plasma}} = 1.31 \cdot V_{\text{Blut}} = 655 \end{array}$$

Bei geringeren Verdünnungen traten Trübungen bei der Neßler-Reaktion oder zu hohe Extinktionen bei der photometrischen Auswertung auf.

4.7. Durchgeführte Bestimmungen

4.7.1. Bestimmung des ASNase-Standardwertes

Der Analysenwert einer ASNase-Lösung definierter Konzentration wurde analog 4.5.1. bestimmt. Nach Abzug des

Reagenzien-Leerwertes wurde die so gefundene Extinktionsdifferenz in Formel (1) eingesetzt.

4.7.2. Bestimmung der Aktivität von in vitro zugesetzter ASNase

Bei den Versuchen interessierte, welche Enzymaktivität wiedergefunden werden konnte, wenn einem Gewebe-Homogenat eine definierte Menge ASNase zugesetzt wurde. Gewebe-Homogenate unbehandelter Mäuse wurden mit ASNase-Lösungen verschiedener Konzentrationen versetzt. Der Analysenwert eines jeden solchen Enzym-Homogenates wurde nach 4.5.1. bestimmt. Auf die gleiche Weise wurde der Analysenwert desselben Homogenates gleicher Verdünnung, aber ohne ASNase-Zusatz, ermittelt (siehe 4.7.3.). Die Differenz beider Extinktionswerte ergab, in Formel (1) eingesetzt, die wiedergefundene Aktivität der zugesetzten ASNase.

4.7.3. Bestimmung der ASNase-Eigenaktivität

Diese erfolgt mit geeigneten Gewebeverdünnungen unbehandelter Mäuse nach 4.5. Zur Berechnung wurde die resultierende Extinktionsdifferenz in Formel (3) eingesetzt.

4.7.4. Bestimmung der ASNase-Aktivitäten in Geweben und im Plasma behandelter Mäuse

Geeignete Gewebe- bzw. Plasmaverdünnungen von behandelten Mäusen wurden analog 4.5. ausgewertet. Die ASNase-Aktivitäten wurden nach Formel (3) berechnet.

4.7.5. Bestimmung der ASNase-Aktivität des Restblutes in den Geweben von behandelten Mäusen

Der Restblutgehalt der Gewebe wurde nach der von A.E.F.H. Meijer angegebenen Methode⁵⁷⁾ bestimmt; es ist dies eine Hämoglobinbestimmung durch photometrische Differenzmessung. Ist der Restblutgehalt bekannt, läßt sich die ASNase-Aktivität des Restblutes ermitteln, denn aus 4.7.4. er-

gibt sich die ASNase-Aktivität des Plasmas und durch Umrechnung diejenige des Blutes von behandelten Mäusen.

4.7.6. Aktivitätsbestimmung der injizierten Fremd-ASNase in den Geweben von behandelten Mäusen

Die Aktivität der Fremd-ASNase wurde für jedes Gewebe errechnet aus dem in 4.7.4. gefundenen Wert durch Abzug der statistisch ermittelten Eigenaktivität und der Restblutaktivität dieses Gewebes.

4.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach den üblichen Regeln für die Gaußsche Normalverteilung. Die Signifikanzberechnung wurde für die t-Verteilung durchgeführt.

4.9. Fehlerabschätzung

Bei den teilweise großen Streuungen der Ergebnisse liegt es nahe, die biologisch bedingten Schwankungen abzugrenzen von denen, die durch Versuchsfehler entstanden sein können.

4.9.1. Untere Nachweisgrenze

Die Bestimmung kleinster Mengen einer Substanz ist gebunden an die methodisch bedingte Erfassbarkeitsgrenze für diese Substanz. Kann die Substanz nicht nachgewiesen werden, so darf man daraus nur schließen, daß sie nicht in ausreichender Menge vorhanden ist, um von der angewandten Methode erfaßt zu werden.

Als Maß für die kleinsten noch nachweisbaren Größen kann die Standardabweichung s des t_0 -Wertes angesehen werden. Dabei kann man den Wert von $1.5 s$ als Maß für die "untere Bestimmungsgrenze" und den von $0.5 s$ als Maß für die "untere Nachweisgrenze" auffassen⁵⁸⁾.

Kleinste ASNase-Aktivitäten werden demnach in den Tabellen wie folgt angegeben:

als definierte Zahl, wenn $E_D > 1.5 \text{ s}$
 als " $< 1.5 \text{ s}$ ", wenn $0.5 \text{ s} < E_D < 1.5 \text{ s}$
 als "n.n." (nicht nachweisbar), wenn $E_D < 0.5 \text{ s}$

4.9.2. Analysengenauigkeit

4.9.2.1. Verdünnungsfehler

Bei der Bestimmung der Frischgewichte der Gewebe muß ein Wägefehler angenommen werden, der durch unterschiedliche Austrocknung während des Wägevorganges zustandekommt. Dieser Fehler macht sich im Endeffekt als Verdünnungsfehler bemerkbar. Der gesamte Verdünnungsfehler $\Delta V/V$ wird, einschließlich Pipettierfehler, mit $\pm 3 \%$ angenommen.

4.9.2.2. Fehler bei der Neßler-Reaktion

Um Trübungen bei der Neßler-Reaktion auszuschließen, wurde mit starken Verdünnungen und sehr hohen Schleuderdrehzahlen gearbeitet. Jedoch sind Extinktionsfehler von ca. 5 % durch Trübungen oder Opaleszenzen nicht auszuschließen, denn solche Fehler sind mit dem Auge nicht mehr wahrnehmbar.

4.9.2.3. Fehler bei der photometrischen Auswertung

Der Streulichtfehler und der Fehler des Durchlaßgrades können vernachlässigt werden.

4.9.2.4. Gesamter Analysenfehler

Nach den üblichen Regeln der Fehlerrechnung⁵⁹⁾ ergibt sich bei einer Beziehung $f(x,y,\dots)$ für den mittleren relativen Fehler von f :

$$\frac{\Delta f}{f} = \sqrt{\frac{\left(\frac{\partial f}{\partial x} \cdot \Delta x\right)^2}{f^2} + \frac{\left(\frac{\partial f}{\partial y} \cdot \Delta y\right)^2}{f^2} + \dots} ;$$

wenn $\Delta x, \Delta y, \dots$ kleine Fehler von $x, y, \dots$ sind.
Wird diese Beziehung auf die vorliegende Formel (3) angewendet, so erhält man für den mittleren relativen Fehler von A:

$$\text{Formel (4)} \quad \frac{\Delta A}{A} = \sqrt{\left(\frac{\Delta V}{V}\right)^2 + \left(\frac{1-E_{to}}{E_A-E_{to}} \cdot \Delta E_A\right)^2 + \left(\frac{E_A-1}{E_A-E_{to}} \cdot \Delta E_{to}\right)^2}$$

Es werden folgende Einzelfehler zugrunde gelegt:

$$\Delta V/V = 3 \% ; \quad \Delta E_A/E_A = \Delta E_{to}/E_{to} = 5 \%$$

4.9.3. Dosierungsfehler

Die Dosierung erfolgte nach der Zahl der Aktivitäts-Einheiten der Trockensubstanz des verwendeten ASNase-Präparates (ca. 200 IU/mg).

Der Dosierungsfehler setzt sich aus den möglichen Einzelfehlern zwischen Einwaage der Trockensubstanz und der Injektion der ASNase-Lösung zusammen.

4.9.3.1. Aktivitätsverlust beim Lösen der ASNase

Für jede der zur Behandlung der Versuchstiere hergestellten Injektionslösungen wurde der ASNase-Standardwert bestimmt. Es ergaben sich trotz gleicher Einwaage, gleicher Lösungsmethode und gleicher Verdünnung relative Aktivitätsverluste bis 20 %.* Um die Ergebnisse von Versuch 5.2.2. miteinander vergleichen zu können, wurden die für die behandelten Mäuse gefundenen ASNase-Aktivitäten durch einen Faktor, der dem jeweiligen relativen Aktivitätsverlust entsprach, korrigiert. Damit sind auch mögliche Fehler bei der Einwaage der Trockensubstanz miterfaßt.

4.9.3.2. Fehler bei der Applikation

Mit einer 1-ml-Rekordspritze wurden pro Tier 0.23 bis

*Die ASNase ist im Vergleich zu anderen Enzymen sehr empfindlich gegen Berührung mit Grenzflächen; beim Schütteln oder beim Durchblasen eines Inertgases, z.B. Stickstoff, tritt innerhalb von 15 bis 30 Minuten fast völliger Aktivitätsverlust auf.

0.43 ml ASNase-Lösung injiziert. Bei einem Meßfehler von 0.005 ml (entspricht 1 Teilstrich) ergibt sich also ein relativer Fehler von maximal $\pm 2\%$. Außerdem ist bei der Injektion ein Substanzverlust möglich. Dieser sei mit einem halben Tropfen Injektionslösung angenommen; das ergibt einen relativen Fehler von maximal -8% . Aus diesen beiden Maximalfehlern ergibt sich ein verbleibender mittlerer Dosierungsfehler von ca 8% . Damit kann auch der mittlere Bestimmungsfehler der ASNase-Aktivität von Geweben behandelter Mäuse infolge Dosierungsfehler mit ca. 8% angenommen werden.

Zusammenfassend zu 4.9. gilt folgendes:

Bei der Angabe kleinster ASNase-Aktivitäten muß die untere Bestimmungs- bzw. die untere Nachweisgrenze beachtet werden.

Die Berechnung der Analysenfehler bei der Bestimmung der Eigenaktivitäten erfolgt nach Formel (4):

Der mittlere relative Bestimmungsfehler der Fremd-ASNase-Aktivität setzt sich zusammen aus den Fehlern von Gesamt-ASNase (nach Formel (4)) und Eigenaktivität - das ergibt sich aus 4.7.6. - außerdem aus einem Dosierungsfehler von 8% . Der Fehler der Restblutaktivität kann vernachlässigt werden. Der resultierende Gesamtfehler wird nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet.

5. Ergebnisse

5.1. Vorversuche

5.1.1. Versuche in vitro: Aktivitätsverhalten zugesetzter Fremd-ASNase in Gewebe-Homogenaten

Es wurden gleichen Volumina von Gewebe-Homogenaten und Tris/HCl-Lösung gleiche Mengen einer ASNase-Lösung zugesetzt. Der Vergleich der wiedergefundenen ASNase-Aktivitäten von Homogenat und zugehöriger Standardlösung zeigte immer eine relative Erhöhung im Homogenat.

Dies ist vom Blutplasma her schon länger bekannt⁴⁶⁾⁵³⁾.

Es ist denkbar, daß sich dahinter eine Aktivierung der ASNase durch das Homogenat verbirgt, aber auch, daß dieser Effekt lediglich infolge einer besseren Stabilität des Enzyms im Homogenat zustandekommt, da ASNase gelöst in einfachen Pufferlösungen sehr instabil ist (siehe Fußnote Seite 18). Außer dieser direkt nachweisbaren Aktivitätserhöhung bei Anwesenheit von Serum- oder Organproteinen besitzen diese daneben noch die Fähigkeit, die ASNase-Aktivität beim Stehen in Lösung über längere Zeit konstant zu halten.

In Tabelle 1 sind die Vergleichsmessungen, die für verschiedene Gewebe der Maus durchgeführt wurden, zusammengestellt. Die relative Erhöhung der ASNase-Aktivität im Gewebe-Homogenat gegenüber dem zugehörigen Standardwert ist in der Tabelle als Aktivitätszunahme in % des Standardwertes angegeben.

Eine Hemmung der ASNase-Aktivität durch Homogenate wurde in keinem Fall beobachtet.

Die Versuche in vitro haben somit gezeigt, daß es durchaus möglich ist, in Organhomogenaten der Maus zugesetzte ASNase aus *Escherichia coli* zu bestimmen. Es ist daher auch zu erwarten, daß in vivo zugesetzte ASNase, sofern sie in die Gewebe eindringt, ebenfalls quantitativ erfaßt

Gewebe	wiedergefundene ASNase [IU]		Aktivitäts- zunahme [%]	mittlere Aktivitäts- zunahme [%]
	Tris/HCl- Lösung	Gewebe- Homogenat V = 100		
Leber	0.017	0.026	53	43
	0.012	0.02	67	
	0.015	0.019	27	
	0.013	0.02	54	
	0.006	0.009	50	
	0.018	0.021	17	
	0.01	0.015	50	
	0.01	0.013	30	
	0.01	0.014	40	
Milz	0.025	0.04	60	51
	0.017	0.026	53	
	0.013	0.019	46	
	0.013	0.019	46	
Nieren	0.025	0.042	68	55
	0.017	0.028	65	
	0.013	0.017	31	
	0.013	0.02	54	
Herz	0.012	0.017	42	35
	0.015	0.019	27	
Muskel	0.009	0.01	11	37
	0.026	0.037	42	
	0.017	0.025	47	
	0.013	0.019	46	
Tumor E6RAD1	0.012	0.015	25	36
	0.012	0.017	42	
	0.012	0.016	33	
	0.015	0.021	40	
	0.015	0.021	40	
Tumor 6C3HED	0.015	0.016	7	6
	0.017	0.018	6	
	0.017	0.018	6	

Tabelle 1: Relative Aktivitätszunahme zugesetzter Fremd-ASNase bei Gewebe-Homogenaten gegenüber Tris/HCl-Lösung. Gleichen Volumina von Gewebe-Homogenat und Tris/HCl-Lösung wurden gleiche Mengen einer ASNase-Lösung zugegeben. Die resultierende Gewebeerdünnung betrug 1:100. Die Organe wurden gesunden C3H/HEJ-Mäusen entnommen, die Tumoren B6AF1- bzw. C3H/HEJ-Mäusen.

werden kann. Eine gewisse Unsicherheit resultiert aus der Aktivitätserhöhung der ASNase durch die Homogenate. Da diese Aktivitätserhöhung ursächlich nicht geklärt ist, ist auf eine entsprechende Korrektur verzichtet worden, und in den folgenden Tabellen und Kurven sind die gemessenen Aktivitäten direkt angegeben.

5.1.2. ASNase-Gewebespiegel als Funktion der Zeit

Für die Versuche 5.2.2. und 5.3. war der ungefähre Zeitpunkt der maximalen ASNase-Konzentration in den einzelnen Geweben behandelter Mäuse bei intraperitonealer Injektion der ASNase wissenswert. Aus diesem Grund wurde der ASNase-Spiegel in den Organen Leber, Milz, Niere, Herz von gesunden C3H/HEJ-Mäusen vom Zeitpunkt der Enzym-Applikation an bestimmt.

Jeweils drei behandelte Tiere wurden 30, 60, 120 und 180 Minuten nach der intraperitonealen ASNase-Injektion von 500 IU pro kg getötet und gleiche Organe gemeinsam ausgewertet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 bis 4 dargestellt.

Es ist zu ersehen, daß die maximale ASNase-Konzentration in den untersuchten Organen 90 bis 120 Minuten nach der Behandlung auftrat.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden in den Versuchen mit intraperitonealer Applikation die Versuchstiere 90 Minuten nach der Enzym-Injektion abgetötet.

Für die intravenöse Applikationsart (Versuche 5.3.2. und 5.3.3.) wurden auf Grund bereits durchgeführter Blutspiegeluntersuchungen⁵³⁾ die Versuchstiere 70 Minuten nach der Behandlung getötet.

5.2. Hauptversuche

Es wurden 3 Gruppen von jeweils 15 B6AFl-Mäusen untersucht.

Gruppe 1: gesunde Mäuse

Gruppe 2: Mäuse mit lymphatischer Leukämie E6RAD1-R

Gruppe 3: Mäuse mit lymphatischer Leukämie E6RAD1-S

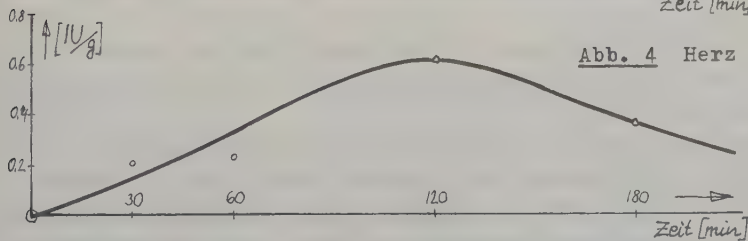
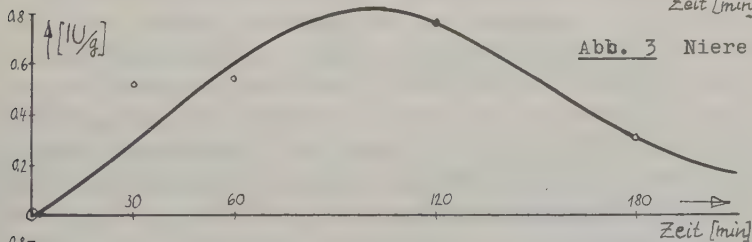
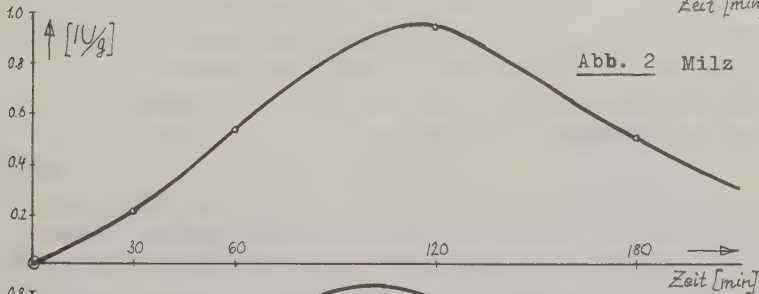
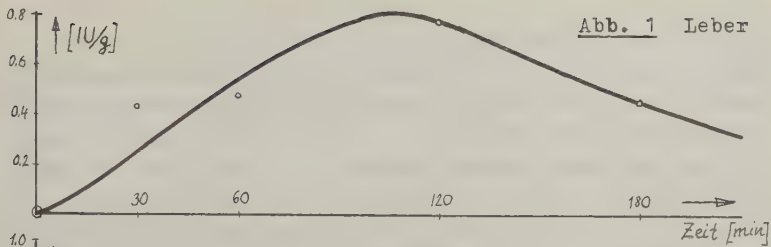


Abb. 1 - 4 Fremd-AS-Nase-Organ Spiegel als Funktion der Zeit nach intraperitonealer Injektion von 500 IU/kg Körpergewicht. Organe: Leber, Milz, Niere, Herz. Pro Zeiteinheit wurden jeweils die Organe von drei C3H/HEJ-Mäusen gemeinsam ausgewertet. Die angegebenen Fremdaktivitäten (IU pro g Feuchtgewicht) wurden durch Subtraktion der Eigenaktivität (Aktivität im Zeitpunkt 0) von der Gesamtaktivität erhalten.

Von jeder Gruppe wurden 8 Tiere mit ASNase in der Dosierung von 500 IU/kg behandelt; die Applikation erfolgte intraperitoneal. Die restlichen 7 Tiere blieben unbehandelt und stellten echte Kontrollen dar: Alle Mäuse innerhalb einer Gruppe stammten aus demselben Kollektiv, waren gleichaltrig und gleichgeschlechtlich; genau wie bei den behandelten Mäusen, wurde auch den unbehandelten - wie schon in 4.1. beschrieben - ein entsprechendes Volumen Lösungsmittel, jedoch ohne ASNase, intraperitoneal injiziert, und 90 Minuten darauf wurden sie abgetötet. Es wurden Plasma, Leber, Milz, Nieren, Herz, Muskulatur, Gehirn und Tumorgewebe untersucht.

5.2.1. Gewebeaktivitäten unbehandelter Mäuse (Eigenaktivität)

In Tabelle 2 sind die gefundenen individuellen ASNase-Aktivitäten zusammengestellt, wobei die untere Nachweisgrenze und die untere Bestimmungsgrenze (siehe 4.9.1.) berücksichtigt wurden. In Tabelle 3 sind den Mittelwerten aus Tabelle 2 und ihren Standardabweichungen die aus 4.9.2.4 berechneten mittleren relativen Bestimmungsfehler gegenübergestellt. Von der Muskulatur abgesehen, bewegt sich der Analysenfehler in tragbaren Grenzen und liegt in Höhe der Standardabweichung.

Die Ergebnisse sind als Eigenaktivitäten zu deuten. Sie sind ein Maß für das Vorhandensein intrazellulärer ASNase in den Geweben.

Im Blutplasma der untersuchten Mäuse war keine Eigenaktivität feststellbar. Dagegen waren in allen Geweben, mit Ausnahme der Muskulatur, Eigenaktivitäten nachweisbar. Diese lagen im Falle von Leber, Milz, Niere und Herz eindeutig über der unteren Bestimmungsgrenze. Für das Gehirn und die beiden Tumoren EARAD1-S bzw. EARAD1-R ergaben sich kleinere Werte, die aber ebenfalls über der unteren Bestimmungsgrenze lagen. Bei der Muskulatur fan-

Kollektiv	Eigen - ASNase - Aktivitäten [IU/m] bzw. [IU/g]					Gehirn	Tumor
	Plasma	Leber	Milz	Nieren	Herz	Muskel	
B6AF1 - Mäuse gesund	<0.07 <0.07 n.n. n.n. n.n. <0.07 n.n.	0.11 0.09 0.12 0.11 0.08 0.09 0.09	0.07 0.07 0.08 0.09 0.07 0.06 0.05	0.13 0.10 0.10 0.09 0.12 0.08 0.07	0.15 0.17 0.17 0.14 0.16 0.16	n.n. 0.02 0.03 0.03 0.04 0.02 0.02	0.02 0.02 0.03 0.03 0.04 0.02 0.02
$\bar{x} \pm s_x$	n.n.	0.1 $\pm$ 0.015	0.07 $\pm$ 0.012	0.1 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.013	<0.02	0.03 $\pm$ 0.004
B6AF1 - Mäuse mit EARAD1 ASNase- resist.	<0.05 <0.05 n.n. <0.05 n.n. n.n. n.n.	0.1 (7)	0.07 (5)	0.06 (7)	0.12 (7)	<0.02 (7)	0.07 0.02 0.06 0.08 0.04 0.03 0.05
$\bar{x} \pm s_x$	n.n.	0.1	0.07	0.06	0.12	<0.02	0.03 $\pm$ 0.004
B6AF1 - Mäuse mit EARAD1 ASNase- sens.	n.n. n.n. <0.05 n.n. n.n. n.n. <0.05	0.09 0.11 0.10 0.05 0.10 0.08 0.10	0.03 0.03 0.05 0.03 0.04 0.03 0.03	0.08 0.07 0.06 0.07 0.09 0.08 0.08	0.12 0.12 0.12 0.08 0.14 0.14 0.12	0.03 0.03 0.03 0.02 n.n. n.n. n.n.	0.02 0.02 0.03 0.03 0.07 0.05 0.05
$\bar{x} \pm s_x$	n.n.	0.09 $\pm$ 0.019	0.03 $\pm$ 0.011	0.08 $\pm$ 0.009	0.12 $\pm$ 0.02	<0.02	0.04 $\pm$ 0.02

Tabelle 2: ASNase-Eigenaktivität gesunder und leukämischer (Tumor EARAD1-S bzw. EARAD1-R) Mäuse des Stammes B6AF1 (Versuch 5.2.1)
 Jedes Kollektiv bestand aus 7 unbehandelten Tieren. Die Einzelwerte jeder Zelle gehören zu einem Tier. Für Sammelbestimmungen ist in der Klammer jeweils die Anzahl der gemeinsam homogenisierten Organe angegeben. x ist der Mittelwert und s_x die zugehörige Standardabweichung. n.n. bedeutet "nicht nachweisbar" und < bedeutet "kleiner als" (siehe 4.9.1.). Die angegebenen Aktivitäten beziehen sich auf 1 ml Plasma bzw. auf 1 g Gewebe (Feuchtgewicht). Die Auswertung erfolgte nach 4.5., die Berechnung nach 4.6., Verdünnungsfaktor V = 1:100.

Kollektiv	Eigen - ASNase - Aktivität mittlerer relativer Analysenfehler [IU/g] [%]						
	Leber	Milz	Nieren	Herz	Muskel	Gehirn	Tumor
B6AF1 - Mäuse mit <u>gesund</u>	0.1 ± 0.015 (7)	0.07 ± 0.012 (7)	0.1 ± 0.02 (7)	0.16 ± 0.013 (7)	nicht mit Sicherheit nachweisbar	0.03 ± 0.004 (7)	
	$\frac{\Delta A}{A} [\%]$	22	19	11	186	32	
B6AF1 - Mäuse mit <u>EARADL-R</u>	0.1 (7)	0.07 (5)	0.06 (7)	0.12 (7)	nicht mit Sicherheit nachweisbar	0.03 ± 0.004 (5)	0.05 ± 0.02 (7)
	$\frac{\Delta A}{A} [\%]$	22	34	17	187	32	25
B6AF1 - Mäuse mit <u>EARADL-S</u>	0.09 ± 0.019 (7)	0.03 ± 0.011 (7)	0.08 ± 0.009 (7)	0.12 ± 0.02 (7)	nicht mit Sicherheit nachweisbar		0.04 ± 0.02 (7)
	$\frac{\Delta A}{A} [\%]$	21	53	27	16	124	33

Tabelle 3: Mittlere ASNase-Eigenaktivitäten gesunder und leukämischer Mäuse und die zugehörigen mittleren relativen Analysenfehler (Versuch 5.2.1.; es handelt sich um dieselben Kollektive wie in Tabelle 2)
Der mittlere relative Analysenfehler ($\Delta A/A$) nach 4.9.2.4. ist in % jeweils unter der mittleren Aktivität angegeben. In den Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Organe angegeben.
Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 2.

den sich Mittelwerte knapp unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze; die Standardabweichungen zeigten daneben die Größenordnung ihrer Mittelwerte und die errechneten mittleren Bestimmungsfehler lagen über 100 %. Es wurde deshalb in Tabelle 3 die Eigenaktivität der Muskulatur als "nicht mit Sicherheit nachweisbar" angegeben.

Die Signifikanzberechnung zeigt für die Eigenaktivitäten von gesunden und kranken (Leukämie EARADl-S) Tieren einen signifikanten Unterschied bei den Organen Milz, Niere und Herz. Innerhalb der einzelnen Kollektive ergibt sich, daß die Eigenaktivität im Herzmuskel signifikant höher als in allen übrigen Geweben ist. Die Organgruppe Leber, Niere, Herz unterscheidet sich daneben hoch signifikant von der Gruppe Muskel, Gehirn, Tumor. Der Unterschied der Eigenaktivitäten bei den beiden Tumoren ist nicht signifikant.

5.2.2. ASNase-Aktivitäten bei behandelten Mäusen

In Tabelle 4 sind die nachgewiesenen individuellen Gesamtaktivitäten von Plasma und Geweben für die drei untersuchten Kollektive angegeben. Für dieselben Kollektive wurden in Tabelle 5 die resultierenden Mittelwerte der Fremd-ASNase-Aktivitäten zusammengestellt. Diese ergeben sich für jedes Gewebe jeweils durch Verminderung der gemessenen Gesamtaktivität (Tabelle 4) um den Betrag der Eigenaktivität aus Tabelle 3 und den Betrag der in diesem Gewebe verbliebenen Restblutaktivität (Tabelle 9); für Milz und Tumorgewebe wurde das Restblut nicht berücksichtigt (siehe dazu 5.3.4.). In Tabelle 5 sind außerdem die errechneten mittleren relativen Bestimmungsfehler angegeben.

Alle bei behandelten Mäusen gefundenen ASNase-Aktivitäten unterscheiden sich hoch signifikant von den entsprechenden Werten der unbehandelten Kontrolltiere; lediglich für die Muskulatur von Mäusen mit dem Tumor EARADl-S ergab sich eine statistische Wahrscheinlichkeit von

Kollektiv	Gesamt - ASNase - Aktivitäten					bzw. [IU/ml]		[IU/g]	
	Plasma	Leber	Milz	Nieren	Herz	Muskel	Gehirn	Tumor	
B6AF1 - Mäuse gesund	1.10 0.22 2.63 1.32 2.01 0.75 3.22 2.66	0.38 0.30 0.62 0.66 0.58 0.30 0.81 0.67	0.58 0.45 0.78 0.76 0.81 0.33 1.09 1.00	0.41 0.30 0.53 0.51 0.53 0.39 0.80 1.00	0.30 0.29 0.47 0.38 0.41 0.28 0.54 0.51	0.07 0.05 0.1 0.09 0.07 0.05 0.09 0.09	0.05 0.02 0.04 0.06 0.06 0.05 0.06		
$\bar{x} \pm s_x$	1.74 ± 1.05	0.54 ± 0.19	0.73 ± 0.26	0.56 ± 0.23	0.4 ± 0.1	0.08 ± 0.019	0.05 ± 0.016		
B6AF1 - Mäuse mit EARAD1-R	1.41 2.00 2.37 0.34 2.33 1.59 2.67 3.64	0.57 (8)	0.43 (8)	0.61 (8)	0.45 (8)	0.05 (8)	0.04 0.07 0.05 0.06 0.06 0.07 0.06	0.37 0.25 0.28 0.16 0.23 0.15 0.21 0.18	
$\bar{x} \pm s_x$	2.04 ± 0.97	0.57	0.43	0.61	0.45	0.05	0.06 ± 0.009	0.23 ± 0.072	
B6AF1 - Mäuse mit EARAD1-S	3.36 1.90 3.57 2.83 3.71 3.36 2.78 3.88	0.51 0.32 0.68 0.54 0.73 0.66 0.65 0.74	0.36 0.25 0.45 0.34 0.44 0.48 0.45 0.42	1.50 0.37 0.97 0.47 0.72 0.79 0.59 0.90	0.65 0.31 0.67 0.61 0.65 0.70 0.48 0.58	0.13 0.06 0.04 0.07 0.07 0.11 0.06 0.11		0.21 0.12 0.26 0.30 0.38 0.19 0.27 0.31	
$\bar{x} \pm s_x$	3.17 ± 0.64	0.6 ± 0.14	0.4 ± 0.08	0.79 ± 0.35	0.58 ± 0.13	0.08 ± 0.032		0.26 ± 0.081	

Tabelle 4: Gesamt-ASNase-Aktivitäten gesunder und leukämischer (Tumor EARAD1-R bzw. EARAD1-S) Mäuse des Stammes B6AF1 (Versuch 5.2.2.)

Jedes Kollektiv bestand aus 8 behandelten Versuchstieren, Behandlungsdosis: 500 IU/kg, Applikationsart: intraperitoneal
Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 2.

Kollektiv	Fremd - ASNase - Aktivität [IU/g] bzw. [IU/ml] mittlerer relativer Bestimmungsfehler [%]								
		Plasma	Leber	Milz	Nieren	Herz	Muskel	Gehirn	Tumor
B6AFL - Mäuse gesund	A' [IU/g] bzw. [IU/ml]	1.74 ± 1.05 (8)	0.42 ± 0.19 (8)	0.66 ± 0.26 (8)	0.45 ± 0.23 (8)	0.22 ± 0.1 (8)	0.08 ± 0.019 (8)	0.02 ± 0.016 (7)	
	$\frac{\Delta A'}{A'}$ [%]	12	13	11	13	18	34	75	
B6AFL - Mäuse mit EAPADL-R	A' [IU/g] bzw. [IU/ml]	2.04 ± 0.97 (8)	0.43 (8)	0.36 (8)	0.52 (8)	0.28 (8)	0.05 (8)	0.02 ± 0.01 (8)	0.18 ± 0.07 (8)
	$\frac{\Delta A'}{A'}$ [%]	11	13	13	13	17	37	72	16
B6AFL - Mäuse mit EAPADL-S	A' [IU/g] bzw. [IU/ml]	3.17 ± 0.64 (8)	0.45 ± 0.14 (8)	0.37 ± 0.08 (8)	0.63 ± 0.35 (8)	0.38 ± 0.13 (8)	0.08 ± 0.032 (8)		0.24 ± 0.08 (8)
	$\frac{\Delta A'}{A'}$ [%]	11	13	13	12	15	28		14

Tabelle 5: Mittlere Fremd-ASNase-Aktivitäten gesunder und leukämischer Mäuse und die mittleren relativen Analysenfehler (Versuch 5.2.2.; es handelt sich um dieselben Kollektive wie in Tabelle 4)
Die Fremd-ASNase-Aktivitäten wurden berechnet aus den mittleren Gesamt-ASNase-Aktivitäten (Tabelle 4) durch Abzug der mittleren Eigenaktivitäten (Tabelle 2) und der Restblutaktivitäten (Tabelle 9). Der mittlere relative Bestimmungsfehler ist in % jeweils unter dem zugehörigen Mittelwert angegeben (Berechnung siehe Zusammenfassung S. 19).
Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 2.

$0.025 < P < 0.0125$. Die Werte der Tabelle 5 sind also ein Maß für die Penetrierbarkeit der untersuchten Gewebe bzw. für die Penetrationsfähigkeit der applizierten ASNase.

Die höchsten Fremd-ASNase-Aktivitäten fanden sich im Blutplasma. Von Muskel und Gehirn abgesehen, lagen demgegenüber die Gewebeaktivitäten zwischen 8 und 38 % bezogen auf die jeweiligen Plasmawerte. Die höchsten Gewebeaktivitäten ergaben sich für die Milz gesunder Mäuse, die niedrigsten für das Gehirn; darauf wird in Abschnitt 6 noch genauer eingegangen.

Die beiden untersuchten Tumorgewebe zeigten eine relativ geringe Penetrierbarkeit; der Unterschied zwischen ASNase-sensiblen und ASNase-resistentem Tumor war dabei nicht signifikant ($0.6 < P < 0.5$). In jedem Kollektiv lag die Fremd-ASNase-Aktivität im Blutplasma hoch signifikant höher als bei allen Geweben. Die Plasmaaktivitäten von Mäusen mit EARADl-S waren signifikant höher als bei gesunden Mäusen oder bei Mäusen mit EARADl-R; für gesunde Mäuse und solche mit EARADl-R ergab sich in dieser Hinsicht kein signifikanter Unterschied. Bei gesunden und kranken (EARADl-S) Tieren fand sich lediglich für die Organe Milz und Herz ein signifikanter Unterschied. Leber, Milz, Niere, Herz und Tumor unterschieden sich hoch signifikant gegenüber Muskel und Gehirn.

5.3. Zusatzversuche

5.3.1. ASNase-Spiegel des subcutan wachsenden Gardner-Lymphoms 6C3HED-OG

In Tabelle 6 sind die gemessenen ASNase-Aktivitäten des ASNase-sensiblen Gardner-Lymphoms von 7 unbehandelten und 7 behandelten Tieren zusammengestellt. Die Behandlungsdosis betrug 500 IU/kg. Die Enzymlösung wurde intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden 90 Minuten nach der Behandlung abgetötet.

	Eigen-ASNase-Aktivität [IU/g]	Gesamt-ASNase-Aktivität [IU/g]	Fremd-ASNase-Aktivität [IU/g]
	0.03	0.16	
	n.n.	0.22	
	0.02	0.23	
	0.03	0.16	
	0.03	0.15	
	0.02	0.17	
	0.03	0.30	
$\bar{x} \pm s_x$	0.02 ± 0.01	0.2 ± 0.05	0.18 ± 0.05

Tabelle 6: ASNase-Aktivitäten im Gardner-Lymphom 6C3HED (Subcutan-Tumor)
7 unbehandelte (Eigenaktivität) und 7 behandelte (Gesamtaktivität) männliche C3H/HEJ-Mäuse; Behandlungsdosis: 500 IU/kg; Applikationsart: intraperitoneal; Fremd-ASNase gleich Gesamt-ASNase minus Eigen-ASNase
Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 2.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Gardner-Lymphom eine geringe Eigenaktivität besitzt. Bei den behandelten Tieren ist Fremd-ASNase mit Sicherheit im Gardner-Lymphom nachweisbar, und zwar ungefähr in der gleichen Größe, wie sie auch beim EARAD1-Tumor zu finden ist.

5.3.2. ASNase-Spiegel von Metastasen des aszitesförmigen Gardner-Lymphoms 6C3HED-OG

Bei der Eröffnung des Abdomens der Versuchstiere für Versuch 5.3.3. fanden sich reichlich Dünndarmmetastasen. Diese wurden abpräpariert und ebenfalls ausgewertet. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Einzelbestimmungen und die resultierenden Mittelwerte der 6 unbehandelten und 6 behandelten Mäuse.

Die Behandlungsdosis betrug 500 IU/kg. Die Enzymlösung wurde bei diesem Versuch in eine Schwanzvene injiziert, da eine intraperitoneale Gabe in etwa einer lokalen Applikation gleichkäme. Die Mäuse wurden 70 Minuten nach

der ASNase-Injektion getötet. Tabelle 7 läßt erkennen, daß in den untersuchten Metastasen die gemessenen Aktivitäten bei den behandelten Tieren wesentlich höher lagen als in dem subcutan verimpften Gardner-Lymphom (Tabelle 6). Die gefundenen Eigenaktivitäten waren in beiden Fällen gleich groß.

Eigen-ASNase-Aktivität [IU/g]	Gesamt-ASNase-Aktivität [IU/g]	Fremd-ASNase-Aktivität [IU/g]
$\angle 0.02$ $\angle 0.02$ 0.02 0.02 0.03 0.02	0.63 0.68 0.34 0.59 0.87 0.44	
$\bar{x} \pm s_x$	0.02 ± 0.01	0.6 ± 0.2
		0.58 ± 0.2

Tabelle 7: ASNase-Aktivitäten im Gardner-Lymphom 6C3HED (Dünndarm-Metastasen des aszitesförmigen Tumors) 6 unbehandelte (Eigenaktivität) und 6 behandelte (Gesamtaktivität) männliche C3H/HED-Mäuse; Behandlung: 500 IU/kg intravenös; Fremd-ASNase gleich Gesamt-ASNase minus Eigen-ASNase
Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 2.

5.3.3. ASNase-Spiegel der Tumorzelle (Gardner-Lymphom 6C3HED-OG)

Diesem Versuch lag die Frage nach dem Wirkungsort der applizierten ASNase zugrunde: Zelle oder Interstitium? Untersucht wurden 12 Mäuse mit einem aszitesförmigen Gardner-Lymphom. 6 Tiere blieben unbehandelt, während die restlichen 6 Tiere mit ASNase der Dosierung 500 IU/kg behandelt wurden. Die Applikation erfolgte intravenös, und zwar in eine Schwanzvene. Nach 70 Minuten wurden die Mäuse getötet.

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

	Eigen-ASNase-Aktivität [IU/g] bzw. [IU/ml]	Gesamt-ASNase-Aktivität [IU/g] bzw. [IU/ml]	Fremd-ASNase-Aktivität [IU/g] bzw. [IU/ml]
6C3HED Aszites- Zellen	< 0.03 n.n. n.n. n.n. n.n. n.n.	n.n. < 0.06 n.n. n.n. < 0.06 n.n.	
$\bar{x} \pm s_x$	n.n.	n.n.	< untere Nachweis- grenze
6C3HED Aszites- Plasma	n.n. n.n. n.n. n.n. n.n. n.n.	0.25 0.18 0.11 0.18 0.25 0.19	
$\bar{x} \pm s_x$	n.n.	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.05

Tabelle 8: ASNase-Spiegel von Asziteszellen im Vergleich zu Aszitesplasma (Gardner-Lymphom 6C3HED) 6 unbehandelte (Eigenaktivität) und 6 behandelte (Gesamtaktivität) C3H/HED-Mäuse, männlich; Behandlung: 500 IU/kg intravenös
Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 2.

Der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ist für das Aszites-Plasma hoch signifikant, dagegen für die Aszites-Zellen nicht signifikant ($0.1 < P < 0.05$). Ein Eindringen der ASNase in die Zellen ist also statistisch nicht nachweisbar. Allerdings ist die ASNase-Bestimmung in den Zellen relativ unempfindlich wegen des geringen Zellgehaltes des Aszites. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0.02 IU/g; der gemessene Mittelwert ist also mindestens zehnmal kleiner als der ASNase-Gehalt der Aszitesflüssigkeit. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß ASNase nicht in die Lymphomzellen eindringen kann.

5.3.4. Restblutbestimmung

Die Bestimmung des in den Organen (Versuch 5.2.2.) zurückgebliebenen Restblutes erfolgte zur Festlegung der Restblutaktivität; diese war zur Berechnung der Fremd-ASNase-Aktivitäten erforderlich.

Die Restblutbestimmung erfolgte genau nach der Beschreibung von Meijer⁵⁷⁾. Bei der Berechnung der Restblutaktivität wurde die ASNase-Aktivität des Blutes zugrunde gelegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Da diese Bestimmung auf der quantitativen Erfassung von Hämoglobin basiert, ergeben sich für das Tumorgewebe, vor allem aber für die Milz, höhere Werte als der Durchblutungsgröße entspricht:

Beim Tumor, infolge zahlreicher arrodierter Gefäße⁶⁰⁾ und bei der Milz, weil dieses Organ auf Grund seiner Abbau-funktion der Erythrozyten vermehrt Hämoglobin enthält. Aus diesem Grund wurde bei Milz und Tumor das Restblut und damit die Restblutaktivität bei der Berechnung der Fremd-ASNase vernachlässigt.

Kollektiv	zugrundege- legte Blut- aktivität	Restblut-ASNase-Aktivität [IU/g]				
		Leber	Nieren	Herz	Muskel	Gehirn
Mäuse <u>gesund</u>	0.95 [IU/ml]	0.02	0.01	0.04	n.n.	0.002
Mäuse mit <u>EARAD1-R</u>	1.56 [IU/ml]	0.04	0.03	0.05	n.n.	0.01
Mäuse mit <u>EARAD1-S</u>	2.42 [IU/ml]	0.06	0.07	0.08	n.n.	

Tabelle 9: ASNase-Aktivität im Gesamtblut [IU/ml] und in dem Restblut [IU/g] der Organe behandelte, gesunde und leukämischer Mäuse von Versuch 5.2.2.

Die mittlere Restblutmenge [ml/g] für jedes Organ innerhalb eines Kollektivs wurde durch Sammelbestimmung gefunden; daraus wurde über die Gesamtblut-Aktivität die ASNase-Aktivität des Restblutes errechnet.

6. Diskussion

Der Befund von Lee und Bridges⁶¹⁾, wonach Serumproteine von Säugetieren in der Lage sind, zugesetzte ASNase aus *Escherichia coli* zu aktivieren, ist nach den hier beschriebenen Vorversuchen dahingehend zu ergänzen, daß auch Organproteine in dieser Richtung wirksam sind. Die genannten Autoren haben allerdings die Ursache der Aktivitätserhöhung nicht näher untersucht und schlechtweg als Aktivierung angesprochen. Nach unseren Untersuchungen ist sicher noch ein anderer Effekt mit im Spiel, nämlich eine Stabilisierung der ASNase durch Serum- oder Organproteine. Ob daneben noch als weiterer Effekt eine Aktivierung im engeren Sinne auftritt, ist noch nicht mit Sicherheit geklärt.

Von den untersuchten Geweben besitzen fast alle eine meßbare Eigenaktivität. Zweifelhaft sind die Ergebnisse bei der Muskulatur - hier liegen die gefundenen Werte knapp unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze - u.U. auch bei Gehirn und Tumor, denn bei diesen Geweben liegen die gefundenen Werte so niedrig, daß es fraglich erscheint, ob ihnen tatsächlich eine enzymatische Hydrolyse des ASN zugrunde liegt. Vor allem bei den ASNase-sensiblen Tumoren wäre das Fehlen einer Eigenaktivität denkbar; andererseits aber ist das Vorhandensein einer solchen Eigenaktivität nicht unbedingt ein Widerspruch, denn einmal sind ihre Werte sehr klein im Vergleich zu tumorhemmenden Fremd-ASNase-Aktivitäten, zum anderen ist es vorstellbar, daß die Michaelis-Konstante der Eigen-ASNase sehr hoch ist, so daß kleine ASN-Konzentrationen kaum abgebaut werden.

Quantitative Vergleichswerte liegen, soweit festgestellt werden konnte, in der Literatur nur für Leber und Milz gesunder Tiere eines anderen Mäusestammes vor⁴⁶⁾; während die Werte für Lebergewebe ungefähr übereinstimmen, konnte Broome in der Milz keine Eigenaktivität nachweisen, was eindeutig in Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht.

Im Blut unbehandelter Mäuse konnte keine ASNase-Aktivität festgestellt werden; dies steht in Einklang mit den Angaben von Broome⁴⁶⁾.

Der Unterschied der Eigenaktivitäten zwischen ASNase-resistenten und -sensiblen EARADl-Tumoren ist nicht signifikant ($0.2 < P < 0.1$). Unabhängig von der obigen Einschränkung kann also festgestellt werden, daß die Eigenaktivität der untersuchten Tumorgewebe kein Kriterium darstellt für die ASNase-Empfindlichkeit dieser Gewebe.

Interessant ist der Vergleich der von uns gefundenen Eigenaktivitäten (Tabelle 3) mit den ASN-Spiegeln, wie sie Broome für Leber, Niere, Milz, ASNase-sensibles und -resistentes Lymphom 6C3HED von unbehandelten Mäusen angibt¹⁹⁾. Der Vergleich ergibt, daß sich Eigenaktivitäten und ASN-Spiegel annähernd umgekehrt proportional verhalten, d.h., daß die Organe mit relativ hoher ASNase-Eigenaktivität (Leber, Niere) einen geringen ASN-Spiegel aufweisen, während die Gewebe mit niedriger Eigenaktivität (Milz, Tumorgewebe) hohe ASN-Spiegel zeigen. Dieser Vergleich macht wahrscheinlich, daß ein Zusammenhang besteht zwischen der intrazellulären ASNase und dem ASN-Spiegel im Gewebe.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit ist wohl der in Tabelle 5 angegebene Befund zu betrachten, wonach exogene ASNase sich nicht nur auf die Blutbahn, sondern auch zu einem gewissen Grad auf die meisten Gewebe verteilt. Dies war a priori keineswegs selbstverständlich, da die ASNase eine hochmolekulare Substanz darstellt und damit die Passage der Gefäßwand sicherlich erschwert ist. Die Frage der Passierbarkeit der Gefäßwand dürfte zweifellos auch für andere exogene Enzyme, die als Medikamente Verwendung finden, z.B. Padutin oder Streptomycin, interessant sein; trotzdem liegen, soweit wir feststellen konnten, hierüber noch keine systematischen Untersuchungen vor.

Während wie gesagt die ASNase offenbar in der Lage ist, die Wand von Gefäßen, vermutlich der Kapillaren, zu durchwandern,

scheint ein Eindringen in die Zellen nicht oder nicht in meßbarem Umfange möglich zu sein. Dies geht u.a. aus unseren Aszites-Versuchen (5.3.3., Tabelle 8) hervor, wonach die mittlere Fremd-ASNase-Aktivität in den Zellen unter der unteren Nachweisgrenze lag und damit um ein Vielfaches kleiner war als die gleichzeitig im Aszitesserum gemessene Aktivität. In einzelnen Fällen lag zwar der ASNase-Gehalt der Zellen über der Nachweisgrenze; doch ist dies noch kein Beweis für eine Penetration, sondern kann auch auf einer Adsorption der ASNase an der Zellwand beruhen. Für die Wirkungsweise der ASNase ergibt sich somit folgendes: Die einfache Vorstellung, daß ASNase in vivo nur dadurch wirkt, daß sie das ASN im Blut bis auf sehr kleine Werte herabsetzt und dadurch die Zellen, die nicht genügend ASN produzieren, von der ASN-Zufuhr abschneidet, ist sicherlich ergänzungsbedürftig. So ist z.B. der Befund, daß manche Lymphomzellen, die in vitro nicht auf ASN-Zufuhr angewiesen waren, sondern offenbar über Asparaginsäure ihren Bedarf an ASN selbst decken konnten, sich aber trotzdem in vivo als ASNase-empfindlich erwiesen, mit einer reinen Unterbindung der ASN-Zufuhr vom Blut her nicht zu erklären. Wenn man sich jedoch etwa in der Art, wie es in dem Schema der Abbildung 5 demonstriert ist, die Wirkung der ASNase in der

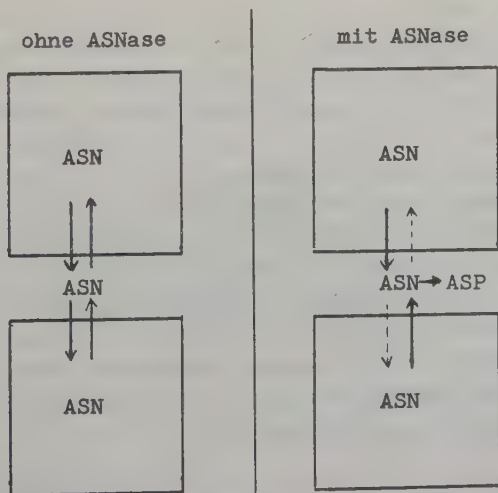


Abb. 5

Wirkungsschema der ASNase im Interstitium
(ASP = Asparaginsäure)

Interzellularflüssigkeit vorstellt, läßt sich dieser scheinbare Widerspruch zwanglos deuten. Die ASNase unterbindet danach nicht nur die hämatogene ASN-Zufuhr, sondern verhindert darüber hinaus ebenso den ASN-Austausch von Zelle zu Zelle, so daß auch das von den Geweben selbst synthetisierte ASN zum Teil abgebaut werden kann.

Die Aufnahmefähigkeit der einzelnen Gewebe für applizierte ASNase ist sehr unterschiedlich. Tabelle 5 zeigt, daß in Leber, Milz und Niere eine relativ hohe, in den untersuchten Tumorgeweben und im Herz eine mittlere und im Skelettmuskel eine geringe Aktivität von Fremd-ASNase gefunde wurde.

Die Unterschiede dürften mit der Größe des Interstitiums und der Durchblutungsgröße der einzelnen Organe zusammenhängen. Vergleichbar in dieser Hinsicht sind z.B. die Mittelwerte von Herz- und Skelettmuskel innerhalb eines Kollektivs in Tabelle 5: Die Durchblutungsgrößen von Herz und Muskulatur verhalten sich wie 20:1 (Ruhewerte)⁶³⁾. In dieser Größenordnung bewegen sich auch die Verhältnisse der gefundenen Fremd-ASNase-Aktivitäten. (Das Verhältnis 20:1 gilt für den Menschen. Für die Maus finden sich in der Literatur darüber keine Angaben, doch liegen hier die physiologischen Verhältnisse ähnlich⁶²⁾).

Auffallend ist das fast völlige Fehlen der ASNase-Aktivität im Gehirn behandelter Mäuse, bei einer ähnlichen Durchblutungsgröße wie sie z.B. die Leber aufweist. Die Ursache dafür kann nur in der Blut-Hirn-Schranke gesehen werden. Damit ist auch die in der Literatur beschriebene verminderte Wirkung der ASNase gegenüber Hirntumoren³⁴⁾⁶⁴⁾ zu erklären.

Die Gewebegängigkeit der Fremd-ASNase bei den untersuchten Tumoren ist unterschiedlich. In den Metastasen des ASNase-sensiblen Gardner-Lymphoms fand sich mehr Fremd-ASNase als beim subcutan wachsenden Gardner-Lymphom, beim EARADl-R oder EARADl-S. Ein signifikanter Unterschied zwischen sensiblen und resistenten EARADl-Geweben ergab sich nicht. Die Aufnahmefähigkeit für ASNase gibt also keinen Hinweis auf die ASNase-Empfindlichkeit von Tumorgeweben.

Auffallend sind die unterschiedlichen Blut- bzw. Plasma-Aktivitäten, die sich aus Versuch 5.2.2. ergeben (Plasmawerte siehe Tabelle 5, aus diesen berechnete Blutwerte siehe Tabelle 9), obwohl bei allen drei Kollektiven gleiche Dosierung und gleiche Einwirkungsdauer des Fremd-Enzyms vorlag. Diese Unterschiede sind nur durch eine verschieden schnelle Eliminierung des Enzyms aus dem Blut zu erklären. Die Milz scheint dabei eine Rolle zu spielen:

Bei der Milz fällt auf, daß der ASNase-Gehalt dieses Gewebes mit steigender Blutaktivität abnimmt, also genau die umgekehrte Tendenz wie die anderen Gewebe zeigt. Ein weiterer auffallender Befund ist die Veränderung des durchschnittlichen Milzgewichtes bei leukämischen Mäusen. In Tabelle 10 sind diese Befunde nebeneinander gestellt:

Kollektiv	ASNase-Aktivität bezogen auf die Werte gesunder Tiere bei		Milzgewichte bezogen auf das mittlere Gewicht von gesunden Tieren
	Blut	Milz	
Mäuse <u>gesund</u>	1	1	1
Mäuse mit <u>EARAD1-R</u>	1.5	0.6	1.6
Mäuse mit <u>EARAD1-S</u>	2.9	0.5	2.5

Tabelle 10: Mittlere ASNase-Aktivitäten von Gesamtblut und Milz, sowie mittlere Milzgewichte aus Versuch 5.2.2. bezogen auf die Werte für gesunde Mäuse (gleich 1 gesetzt) Zugrunde gelegte Aktivitäten aus Tabelle 9 bzw. 3; mittlere Milzgewichte jeweils aus 15 Einzelbestimmungen ermittelt.

Im Verlauf einer Leukämie kommt es zu Veränderungen in der Milz. Diese Veränderungen, für deren Stärke die Gewichtszunahme einen gewissen Maßstab darstellt, sind bei B6AF1-Mäusen mit lymphatischer Leukämie E6RAD1 histologisch noch nicht untersucht worden. Es ist aber wahrscheinlich, daß diese Veränderungen ähnlich sind, wie bei allen vergleichbaren Leukämien. Dabei wird durch Proliferation der lymphatischen Follikel und Infiltration lymphatischer Zellen die rote Milzpulpa zunehmend verdrängt und es ergibt sich eine Funktions-einbuße, vor allem in Hinblick auf die für die Milz charakteristische Reinigung des Blutplasmas.

Es ist denkbar, daß in diesem Funktionsverlust eine Ursache zu finden ist für die verlangsamte Elimination der applizierten ASNase aus dem Blut leukämischer Mäuse. Dies würde voraussetzen, daß die Elimination normalerweise durch das Retikulum geschieht. Dann müßte auch infolge der hohen Speicherfähigkeit der Retikulumzellen vermehrt ASNase in der Milz gesunder Mäuse nachweisbar sein. Wie Tabelle 5 zeigt, ist das tatsächlich der Fall: Die höchsten gemessenen Fremd-ASNase-Werte wurden in der Milz gesunder behandelter Mäuse gefunden.

Die mögliche Beteiligung der Milz an der Elimination der ASNase aus dem Blut ergibt sich auch durch Versuche von Pütter⁶⁵⁾: Aus Rinder-Milz isoliertes Kathepsin verursacht einen beschleunigten Abbau der ASNase.

Broome vermutet als Ursache für die verlangsamte Elimination der ASNase bei Tumor-Mäusen ein von den Tumorzellen produziertes "übertragbares Agens" unter Mitwirkung des sog. "lactic dehydrogenase virus"⁴⁶⁾, welcher in den von Broome untersuchten 6C3HED-Zellen nachweisbar ist⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾.

7. Zusammenfassung

Der Asparaginase(ASNase)-Gehalt einiger Organe und des Blutes von gesunden und tumortragenden Mäusen sowie einiger Tumorgewebe wurde unter ASNase-Behandlung untersucht.

Auch ohne Applikation von ASNase ist in den meisten Organen eine zwar geringe, aber deutlich meßbare ASNase-Aktivität zu finden. Die größte Aktivität wurde im Herzmuskel gefunden. Das Blutplasma hatte keine meßbare Eigenaktivität.

Nach intraperitonealer oder intravenöser Gabe von ASNase aus *Escherichia coli* findet sich diese nicht nur im Blutplasma und in fast allen untersuchten Organen, sondern auch in den untersuchten Tumoren, dem Gardner-Lymphom und der Leukämie EARAD1. Die Zeitabhängigkeit der ASNase-Aktivität nach Applikation wurde in einigen Organen bestimmt.

90 Minuten nach intraperitonealer Gabe wurde die höchste Organaktivität bei gesunden Mäusen in der Milz und bei leukämischen Mäusen in der Niere gefunden. Bei den tumortragenden Tieren lagen die Organspiegel mit Ausnahme der Milz durchweg höher als bei gesunden Mäusen. In der Mehrzahl der untersuchten Organe bzw. Gewebe, nämlich bei Leber, Milz, Niere, Herz und Tumor betrugen die Aktivitäten 8 bis 38 % derjenigen des Blutplasmas. Ein signifikanter Unterschied zwischen ASNase-sensiblen und ASNase-resistentem EARAD1-Tumor bestand nicht. Nach intravenöser Behandlung von Mäusen mit aszitesförmigem Gardner-Lymphom war ASNase in der Aszitesflüssigkeit, aber nicht in den Asziteszellen zu finden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die ASNase einen wesentlichen Teil ihrer Wirkung 90 Minuten nach therapeutischer Gabe in der Interzellularflüssigkeit ausübt. Ein entsprechendes Wirkungsschema wird angegeben.

Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen

A	=	Aktivität
ASN	=	L-Asparagin
ASNase	=	L-Asparaginase
E_A	=	Extinktion des Analysenwertes
E_D	=	Extinktionsdifferenz
E_{t_0}	=	Extinktion des t_0 -Wertes
IU	=	Internationale Einheit
MSchS	=	Meerschweinchenserum
s_x	=	Standardabweichung
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	=	Verdünnungsfaktor
$\bar{x}$	=	Mittelwert

Literaturverzeichnis

- 1) Lang, E. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., 5, (1904)
- 2) Clementi, A. Arch. intern. Physiol., 19, 369, (1922)
- 3) Kidd, J.G. J. exp. Med., 98, 565, (1953)
- 4) Broome, J.D. Nature, 191, 1114, (1961)
- 5) Broome, J.D. J. exp. Med., 118, 99, (1963)
- 6) Broome, J.D. J. exp. Med., 118, 121, (1963)
- 7) Old, L.J., Boyse, E.A., Nature, Lond., 198, 801, (1963)
Campbell, H.A.,
Daria, G.M.
- 8) Homquist, N.D. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 113, 444, (1963)
- 9) Mashburn, L.T., Biochem. Biophys. Res. Comm., 12, 50, (1963)
Wriston, J.C., Jr.
- 10) Campbell, H.A., Proc. Am. Ass. Cancer Res., 5, 10, (1964)
Old, L.J.,
Boyse, E.A.
- 11) Suld, H.M., J. biol. Chem., 240, 2234, (1965)
Herbut, P.A.
- 12) Yellin, T.O., Science, N. Y., 151, 998, (1966)
Wriston, J.C., Jr.
- 13) Hiramoto, R., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 121, 597, (1966)
Tate, C., Hamlin, M.
- 14) Sobin, L.H., ibid., 119, 325, (1965)
Kidd, J.G.
- 15) Sobin, L.H., J. exp. Med., 123, 55, (1966)
Kidd, J.G.
- 16) Kidd, J.G., Cancer Res., 26, 208, (1966)
Sobin, L.H.
- 17) Boyse, E.A., J. exp. Med., 125, 17, (1967)
Old, L.J.,
Campbell, H.A.,
Mashburn, L.T.

- 18) Broome, J.D. Trans. N. Y. Acad. Sci., 30, 69., (1968)
- 19) Broome, J.D. J. exp. Med., 127, 1055, (1968)
- 20) Patterson, M.K.,
Conway, E.,
Whittle, W.,
McCoy, T.A. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 119, 5, (1965)
- 21) Miller, H.K.,
Salser, J.S.,
Balis, M.E. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 9, Mar, 49, (1968)
- 22) Mashburn, L.T.,
Gordon, C.S. Cancer Res., 28, 961, (1968)
- 23) Eagle, H.,
Washington, C.L.
Levy, M., Cohen, L. J. Biol. Chem., 241, 4994, (1966)
- 24) Broome, J.D.,
Schwartz, J.H. Biochim. Biophys. Acta, 138, 637, (1967)
- 25) Patterson, M.K., Jr.,
Orr, G.R. J. Biol. Chem., 243, 376, (1968)
- 26) Prager, M.D.,
Bachynsky, N. Federation Proc., 31, 43, (1968)
- 27) Kwak, K.S.,
Jameson, E.,
Ryan, R.M.,
Kurtz, H.M. Cancer Res., 21, 44, (1961)
- 28) Jameson, E.,
Ainis, H., Ryan, M. Science, 124, 980, (1956)
- 29) Old, L.J.,
Boyse, E.A.,
Campbell, H.A.,
Brodley, H.S.,
Fidler, J., Teller, J.D. Cancer Res., 20 (7), 1066, (1967)
- 30) Old, L.J.,
Boyse, E.A.,
Campbell, H.A.,
Brodley, H.S.,
Fidler, J., Teller, J.D. Lancet, i, 447, (1967)
- 31) Boiron, M., Thomas, M. Concours méd., 90, 6959, (1968)

- 32) Oettgen, H.F., Blood, 30, 852, (1968)
Old, L.J., Boyse, E.A.,
Campbell, H.A.,
Philips, F.S.,
Clarkson, B.D.,
Tallal, L.,
Leeper, R.D.,
Schwartz, M.K., Kim, J.H.
- 33) Arens, A., Hoppe Seyler's Z. physiol.
Rauenbusch, E., Chem. 351, 197 (1970)
Irion, E.,
Wagner, O.,
Bauer, K., Kaufmann, W.
- 34) Dolowy, W.C., Cancer, 19, 1813, (1966)
Henson, D., Cornet, J.,
Sellin, H.
- 35) Oettgen, H.F., Cancer Res., 27, 2619, (1967)
Old, L.J.,
Boyse, E.A.,
Campbell, H.A.,
Philips, F.S.,
Clarkson, B.D.,
Tallal, L.,
Leeper, R.D.,
Schwartz, M.K.,
Kim, J.H.
- 36) Burchenal, J.H. Med. Trib., 2, 1 und 26, (1968)
- 37) Oettgen, H.F., J. Clin. Invest., 47, 74a, (1968)
Old, L.J., Boyse, E.A.,
Schwartz, M.K.
- 38) Oettgen, H.F. Med. Trib., 2, 1 und 16, (1968)
- 39) Hill, J.M., et al. J. Amer. med. Assoc., 202, 882,
(1967)
- 40) Zittle, C.A. The Enzymes, vol. 1, part 2, S. 922,
New York, 1951
- 41) Tower, D.B., J. biol. Chem., 238, 983, (1963)
Peters, E.L.,
Curtis, W.C.
- 42) Suld, H.M., J. biol. Chem., 240, 2234, (1965)
Herbut, P.A.
- 43) Euler, H. von Hoppe-Seylers Zschr. physiol. Chem.,
321, 201, (1960)
- 44) Ohnuma, T., Bergel, F., Biochem. J., 103, 238, (1967)
Bray, R.C.
- 45) Broome, J.D. J. Natl. Cancer Inst., 35, 967,
(1965)

- 46) Broome, J.D. Brit. J. Cancer, 22, 595, (1968)
- 47) Mashburn, L.T., Arch. Biochem. Biophys., 105, 450,
Wriston, J.C. (1964)
- 48) Rowley, B., Biochim. Biophys. Res. Commun., 28,
Wriston, J.C. 160, (1967)
- 49) Schwartz, J.H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 56,
Reeves, J.Y., 1516, (1966)
Broome, J.D.
- 50) Campbell, H.A., Biochemistry, 6, 721, (1967)
Mashburn, L.T.,
Boyse, E.A., Old, L.J.
- 51) Wade, H.E., Lancet, II, 7571, (1968)
Elsworth, R.,
Herbert, D.,
Keppie, J.,
Sargeant, K.
- 52) Broome, J.D. J. exp. Med., 127, 1036, (1968)
- 53) Pütter, J., Wuppertal unveröffentlichte Versuche
- 54) Dolowy, W.C., Nature, 218, 1028, (1968)
Schrek, R.,
Henson, D.,
Cornet, J., Brown, E.
- 55) Pütter, J. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 10,
8, (1960)
- 56) Stauff, J., In Biochem. Taschenbuch, hgg. v.
Jaenicke, R. H.M. Rauen, Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York, 1964,
Teil 2, S. 37
- 57) Meijer, A.E.F.H. Clin. Chim. Acta, 7, 638, (1962)
- 58) Frehse, H., Pflanzensch.-Nachr. "Bayer", 15,
Niessen, H., Tietz, H. 113, (1962, 3)
- 59) Akademischer Verein Hütte, Theoretische Grundlagen,
Hütte, E.V., Berlin 28. Auflage, Verlag Wilhelm Ernst
& Sohn, Berlin 1955, S. 193 u. 208
- 60) Grundmann, E., unveröffentlichte Untersuchungen
Wuppertal
- 61) Lee, M.B., Nature, 217, 758, (1968)
Bridges, J.M.

- 62) Green, E.L. Biology of the Laboratory Mous,
2nd Edit., The Blakiston Division,
Mc Graw-Hill Book Company,
New York, Toronto, Sydney, London,
S. 348
- 63) Schneider, M. Physiologie des Menschen, 15. Auf-
lage, Springer Verlag, Berlin-
Göttingen-Heidelberg, S. 168
- 64) Dolowy, W.C., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 123,
Cornet, J., Henson, D., 133, (1966)
Ammeraal, R.
- 65) Pütter, J., Wuppertal Vortrag auf dem internat. Symposium
über Asparaginase, Wuppertal, 1969
- 66) Riley, V., Lilly, F., Science, N. Y., 132, 545, (1960)
Huberto, E.,
Bardell, D.
- 67) Plagemann, P.G.W., Can. J. Microbiol., 9, 75, (1963)
Gregory, K.F.,
Swim, H.E., Chan, K.K.W.
- 68) Riley, V. Nature, 220, 1245, (1968)

L E B E N S L A U F

Am 21. September 1936 wurde ich, Ulrich Wierer, als Sohn von Dr.-Ing. Hans Wierer und seiner Ehefrau Anny, geb. Oehl, in Berlin geboren.

In Graz, Österreich, besuchte ich die Volksschule und sechs Klassen der dortigen Oberrealschule. 1953 übersiedelte meine Familie nach Erlangen; hier legte ich 1956 die Reifeprüfung an der Ohm-Oberrealschule ab.

In den Jahren 1956 bis 1962 studierte ich an der Technischen Hochschule in München Elektrotechnik und schloß dieses Studium mit dem Grad eines Diplom-Ingenieurs ab. Danach arbeitete ich bis 1965 für die Siemens-Schuckertwerke AG in Erlangen.

Mit dem Wintersemester 1965 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Medizin. Im Oktober 1967 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab und beendete im Januar 1971 die ärztliche Prüfung.

Die vorliegende Arbeit habe ich im August 1968 begonnen; den experimentellen Teil konnte ich in den Laboratorien der Farbenfabriken Bayer AG in Wuppertal durchführen. Die Arbeit wurde angeregt und geleitet von Herrn Priv.-Doz., Dr. med., Dipl.-Chem. J. Pütter.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
